

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12M 1/24, 3/06	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/06239 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Februar 1997 (20.02.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01485 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. August 1996 (03.08.96) (30) Prioritätsdaten: 195 29 099.2 8. August 1995 (08.08.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, D-52425 Jülich (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEUSTER-BOTZ, Dirk [DE/DE]; Soerser Weg 1a, D-52070 Aachen (DE). ALTENBACH-REHM, Jutta [DE/DE]; Trierer Strasse 110, D-52078 Aachen (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Rechts- und Patentabteilung, D-52425 Jülich (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	

(54) Title: DEVICE FOR THE SERIES CULTIVATION OF MICRO-ORGANISMS OR CELLS IN GASIFIED LIQUID COLUMNS

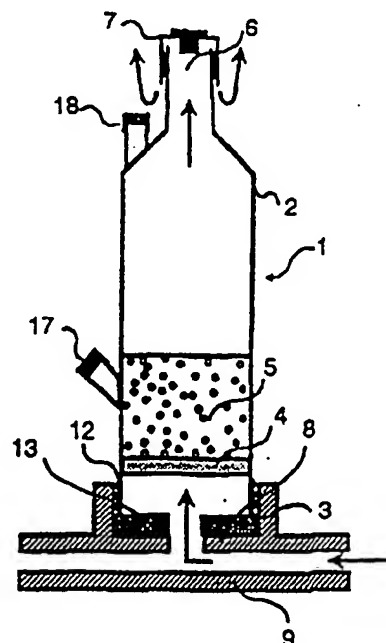
(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUR SERIEN-KULTIVIERUNG VON MIKROORGANISMEN BZW. ZELLEN IN BEGASTEN FLÜSSIGKEITSSÄULEN

(57) Abstract

A device having a series of culture flasks with an open or perforated base having a gas-permeable porous filter plate above the base or base aperture, the porosity and hydrophobic nature of which are adequate to prevent liquid from leaking from a culture fluid column above said filter, is suitable for the series cultivation of micro-organisms or cells in gasified liquid columns. Said culture flasks can be connected to a sterile gas feed via their bases. A gastight double-bottom with a sterile gas feed pipe, the upper plate of which has a series of positions having gas apertures to accept and seal the culture flasks, is particularly suitable as the sterile gas feed. There is advantageously a thermostatically controlled hood covering the series of culture flasks and capable of forming a seal against the double bottom. The sterile gas feed is advantageously fitted with pressure and flow-meters and gas moisturisers. The double bottom may be divided into compartments by suitable webs so that different groups of flasks can be individually supplied.

(57) Zusammenfassung

Für die Serien-Kultivierung von Mikroorganismen bzw. Zellen in begasteten Flüssigkeitssäulen eignet sich eine Vorrichtung, die eine Serie von Kulturflaschen mit einem offenen oder perforierten Boden aufweist, die oberhalb des Bodens bzw. der Bodenöffnung eine gasdurchlässige poröse Filterplatte haben, deren Porenfeinheit und Hydrophobizität ausreichen, den Flüssigkeitsablauf aus einer darüber befindlichen Kulturflüssigkeitssäule zu unterbinden. Diese Kulturflaschen sind über ihren Boden mit einer Sterilgaszuleitung in Verbindung (zu bringen). Für die Sterilgaszuleitung eignet sich insbesondere ein gasdichter Doppelboden mit Sterilgaszuleitung, dessen obere Platte mit einer Serie von Gasdurchlaßöffnungen aufweisenden Aufnahmeplätzen für den abgedichteten Einsatz der Kulturflaschen versehen ist. Zweckmäßig ist eine die Kulturflaschenserie übergreifende, auf den Doppelboden dicht aufsetzbare Abdeckhaube mit Thermostatisierung. In der Sterilgaszuleitung sind zweckmäßigerweise Druck- und Durchflußmesser sowie Gasbefeuchter. Der Doppelboden kann durch entsprechende Stege in Kompartimente für die Einzelversorgung unterschiedlicher Flaschengruppen unterteilt sein.



B e s c h r e i b u n g

Vorrichtung zur Serien-Kultivierung von Mikroorganismen
bzw. Zellen in begasten Flüssigkeitssäulen

Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung zur Serien-Kultivierung von Mikroorganismen bzw. Zellen in begasten Flüssigkeitssäulen, und sie umfaßt dafür geeignete Kulturflaschen.

Zur Durchführung von Reihenuntersuchungen auf festen Nährböden ist die Verwendung von Agarplatten gebräuchlich. Hierbei werden die Mikroorganismen als Einzelkeime auf den festen Nährboden gebracht und bei der jeweiligen Reaktionstemperatur inkubiert. Der Stofftransport (Substrat aus dem festen Nährboden und Sauerstoff aus der Gasphase) erfolgt rein diffusiv.

Das klassische Instrument zur Kultivierung von Mikroorganismen für Serienuntersuchungen stellt die Schüttelkolbentechnik dar. Hierbei lassen sich bei Reaktionsvolumina von wenigen ml bis zu 1000 ml mit Hilfe von Schüttelinkubatoren viele Experimente parallel durchführen. Der Energieeintrag zur Dispergierung der Flüssigphase (Medium und Mikroorganismen) erfolgt dabei über eine kreisförmige Bewegung aller Reaktionsgefäße, die auf einem Tablett angeordnet sind. Der Sauer-

stoffeintrag ist hierbei nur über eine Oberflächenbegasung möglich. Der Stofftransport erfolgt in der Flüssigphase konvektiv.

5 Zur Miniaturisierung dieser Technik (um noch mehr Versuche parallel durchführen zu können) wurde versucht, Mikrotiterplatten als Reaktionsgefäße zu nutzen. Insbesondere Probleme bei der Verdunstung aufgrund des ungünstigeren Oberfläche / Volumenverhältnisses verhin-
10 derten eine Anwendung dieser Technik.

Eine apparatetechnisch sehr aufwendige Technik zur Durchführung von Serienuntersuchungen mit Mikroorganismen ist der parallele Einsatz von Laborfermentern.
15 Hier werden Geräte angeboten, die eine Paralleldurchführung von bis zu 6 Fermentationen mit einem Gerät ermöglichen. Der Energieeintrag erfolgt hierbei über Standardrührorgane; über eine Begasungseinrichtung ist eine Volumenbegasung möglich.

20 Ziel der Erfindung ist daher eine relativ einfache apparative Anordnung zur Serienkultivierung, bei der eine ausreichende Begasung gewährleistet werden kann.

25 Dieses Ziel wird mit einer Vorrichtung gemäß der Erfindung erreicht, die im wesentlichen gekennzeichnet ist durch eine Serie von Kulturflaschen mit einem offenen oder perforierbaren Boden, die oberhalb des Bodens bzw. der Bodenöffnung mit einer gasdurchlässigen porösen
30 Filterplatte ausgestattet sind, deren Porenfeinheit und

Hydrophobizität ausreichen, den Flüssigkeitsablauf aus einer darüber befindlichen Kulturflüssigkeitssäule zu unterbinden und die über ihren Boden mit einer Sterilgaszuleitung gasdicht verbunden bzw. zu verbinden sind.

5

Eine solche Anordnung einer Serie von Kulturflaschen, die über ihren Boden mit einem Gasverteiler in Verbindung stehen, kann mit unterschiedlichen Gasverteilern in Form von Schlauchzuleitungen oder Zuleitungen über Bohrungen versehen und mit einem Serien-Stativ ausgerüstet sein.

10

Besonders zweckmäßig ist jedoch ein als Gasverteiler wirkender, mit Sterileinlaß für Gas versehener, gasdichter Doppelboden für die Sterilgaszuleitung, dessen obere Platte mit einer Serie von Gasauslaßöffnungen aufweisenden Aufnahmeplätzen für den abgedichteten Einsatz bzw. Aufsatz der Kulturflaschen versehen ist.

15

D.h., zwischen dem oberen Boden des Gasverteilers und dem unteren Ende der Kulturflasche, wird für eine dichte Verbindung coaxial zur Gasverbindungsbohrung des Gasverteilers gesorgt.

20

Weitere Besonderheiten der Erfindung ergeben sich aus den Patentansprüchen.

25

Gemäß der Erfindung werden insbesondere folgende Verbesserungen erzielt:

1. Wesentliches Problem bei der Kultivierung von
aeroben Mikroorganismen ist die Sauerstoffversor-
gung. Durch die Verwendung von begasten Säulen zur
Kultivierung von Mikroorganismen für Reihenunter-
suchungen ist aufgrund der Volumenbegasung eine
weitaus bessere Sauerstoffversorgung der Mikroor-
ganismen als im herkömmlichen Schüttelkolben mög-
lich. Der Unterschied im Sauerstoffeintragsvermö-
gen zwischen Oberflächenbegasung und Volumenbega-
sung kann je nach Oberfläche/Volumenverhältnis
mehr als 1 Zehnerpotenz betragen.
2. Das wesentliche Problem bei der Nutzung von Daten,
die in kleinen Reaktionsgefäßen gewonnen werden,
ist die Übertragung dieser Ergebnisse in den Reak-
tor. Durch die Verbesserung der Sauerstoffversor-
gung in der begasten Säule auf Werte, wie sie in
technischen Reaktoren erhalten werden, ist eine
Maßstabsübertragung besser möglich, insbesondere,
da das verwendete Verfahren zur Sauerstoffversor-
gung (Volumenbegasung) identisch ist. Damit kann
die Entwicklungszeit von Verfahren zur Herstellung
von Produkten mit Mikroorganismen verkürzt werden.
3. Gegenüber der Verwendung von parallelen Laborreak-
toren zur Kultivierung von Mikroorganismen für
Reihenuntersuchungen ist der apparative und damit
finanzielle Aufwand bei der Verwendung von bega-
sten Säulen bedeutend geringer.

Nachfolgend sind zur Veranschaulichung der Erfindung in ihren Besonderheiten Zeichnungen beigelegt. Es zeigen schematisch:

- 5 Fig. 1 einen Vertikalschnitt durch eine erfindungs-
 gemäßige Serienkultur-Anordnung;
 Fig. 2 eine einzelne Kulturflasche im Detail in
 Schnittdarstellung;
 Fig. 3 eine Variante zur Aufnahmeplatz- und Fla-
10 schenbodenausgestaltung;
 Fig. 4 eine Unterteilung der Anordnung in unter-
 schiedliche Begasungsreihen in Aufsicht;
 Fig. 5 einen Vergleich der parallelen Kultivierung
 von *Corynebacterium glutamicum* Bakterien zur
15 L-Isoleucin-Herstellung in erfindungsgemäßen
 Kulturflaschen (begasten Säulen) und in
 Schüttelkolben;
 Fig. 6 einen Vergleich der volumetrischen Stoffüber-
 gangskoeffizienten ($k_L a$) für erfindungsgemäße
20 Kulturflaschen (begaste Säulen), Schüttelkol-
 ben und 2 l Rührreaktor, die nach der Sulfit-
 methode bei 30°C bestimmt worden sind.

Fig. 1 zeigt eine Anordnung mit einer Mehrzahl von Kulturflaschen 1, die in Fig. 2 näher ausgeführt sind. Ein allgemein zylindrisches Glasgefäß 2, welches am Boden 3 offen oder mit einer Öffnung zur Einleitung von Gas versehen ist, enthält im unteren Teil eine poröse Filterplatte 4 (z.B. aus Borosilikatglas) insbesondere über die gesamte Querschnittsfläche, durch die das Gas

in die darüberstehende Flüssigphase 5 (Medium mit Mikroorganismen) eingetragen wird. Am Kopf der Flasche 1 befindet sich eine Öffnung 6 zur Aufnahme von Standardvorrichtungen wie z. B. Sterilstopfen oder Aluminiumkappen 7, die ein Entweichen des Gases ohne Kontamination des Glasgefäßinhalts ermöglichen.

Mehrere Kulturflaschen 1, bevorzugt mit einem umschlossenen Volumen von 10 bis 1000 ml und einem Durchmesser von 10 bis 100 mm sind (insbesondere) gleichverteilt in napfartigen Aufnahmeplätzen 8 eines Gasverteilers 9 befestigt, der mit entsprechenden Anschlußstutzen zur Gasversorgung 10 der einzelnen Kulturflaschen 1 versehen ist. Dieser Gasverteiler 9 besitzt neben den Aufnahmeplätzen zur Gasversorgung und Befestigungsmitteln für die einzelnen Kulturflaschen eine oder mehrere zentrale Gaszufuhreinrichtungen, die jeweils mit einem Sterilfilter 11 versehen sind. Der Gasverteiler 9 ist zusammen mit den daran befestigten Kulturflaschen 1 autoklavierbar.

Die Fixierung der Kulturflaschen 1 in bzw. an den Aufnahmeplätzen 8 erfolgt zweckmäßigerweise über Verschraubungen oder Bajonetverschlüsse (bei 12) mit Dichtungsringen 13. Ggf. sind in den Aufnahmeplätzen des Gasverteilers 9 zur Aufnahme der Kulturflaschen 1 Anstechvorrichtungen 14 angebracht, wie in Fig. 3 angedeutet, die eine Boden-Membran der Flasche durchstechen. Damit ist eine getrennte Sterilisation und nach-

trägliche Sterilverbindung von Gasverteiler und Kulturflaschen möglich.

5 Zur Temperierung ist der Gasverteiler mit den einzelnen Kulturflaschen in einem temperierten Gehäuse 15 installierbar, bzw. mit einer Abdeckhaube versehen, so daß die Reaktionstemperatur geregelt werden kann.

10 Die Medien und die Animpfbiomasse können nach dem Autoklavieren mit Standardtechniken steril zugegeben werden, um den Prozeß zu starten. Hierbei ist ein Flüssigvolumen 5 bis maximal 50 % des umschlossenen Volumens der Kulturflaschen besonders günstig, um ein Ausschäumen bei eventueller Schaumbildung zu verhindern.

15 Um auch im unbegasten Zustand ein Eindringen von Medium in den Gasverteiler zu unterbinden, sind die Kulturflaschen mit porösen Filterplatten ausgestattet, deren Porendurchmesser so fein ist, daß der hydrostatische
20 Druck der darüberstehenden Flüssigkeitssäule nicht ausreicht, die Kapillaren der porösen Filterplatte zu füllen. So können im allgemeinen Filterplatten mit einem Porendurchmesser von maximal 20 µm Flüssigkeitssäulen von ca. 10 cm Höhe im unbegasten Zustand oberhalb der
25 porösen Filterplatten halten. Zusätzlich kann die innere Oberfläche der porösen Filterplatten mit bekannten Mitteln hydrophobisiert werden. Besonders geeignete Techniken zur Herstellung von hydrophoben Glasoberflächen sind aus der Silan- bzw. Siliconchemie bekannt.

30

Das zur Begasung eingesetzte Gas wird vor dem Einleiten in den Sterilfilter 11 des Gasverteilers 9 mit Wasserdampf in einem Gasbefeuchter 16 (z.B. mittels entsprechender Waschflaschen) bei der eingestellten Reaktionstemperatur gesättigt, um eine Volumenabnahme in den begasten Säulen durch Verdunstung zu unterbinden.

Der Gasvolumenstrom (z.B. Luft oder mit Sauerstoff angereichertes Gasgemisch) kann auf Volumenströme z.B. bis zu 2,5 l Gas/l Reaktionsvolumen * Minute) vorgegeben werden. Bei Einsatz mehrerer parallel angeordneter Gaszufuhreinrichtungen für jeweils 1 Reihe von begasten Säulen kann für jede der unterschiedlichen Gaszufuhreinrichtungen ein anderer Gasvolumenstrom vorgegeben werden, wie in Fig. 4 angedeutet ist.

Zur Probenahme während der Reaktion sind die Kulturflaschen ggf. mit seitlichen Probenahmestutzen 17 und Septum versehen, über welches mit Hilfe einer Kanüle jederzeit eine definierte Probemenge steril entnommen werden kann.

Zur Aufnahme von Meßsonden (z.B. zum Messen von pH-Wert oder pO_2 -Wert) ist ggf. am Kopf der begasten Säulen ein weiterer Stutzen 18 angebracht.

Bei Verwendung von Aluminiumkappen ('Alucaps') 7 zur kontaminationsfreien Entfernung des Gases aus den begasten Säulen ist ggf. durch Anbringen eines Septums und Anbindung von miniaturisierten Substratleitungen die

kontinuierliche Zudosierung von Substraten oder Korrekturmitteln während der Reaktion möglich.

Als Anwendungsgebiete sind

5

- die biotechnologische Forschung (als Alternative zur bisher üblichen Verwendung von Schüttelkolben) und

10

- die industrielle Prozeßentwicklung zur Herstellung von Produkten mit Mikroorganismen (mehr als 90 % der Experimente, die im Rahmen einer industriellen Prozeßentwicklung durchgeführt werden, erfolgen im Schüttelkolben) zu nennen.

15

Es folgen Beispiele, welche die Tauglichkeit der erfindungsgemäßen Anordnung veranschaulichen:

20

Beispiel 1: Vergleich der volumetrischen Sauerstoffeintragskoeffizienten ($k_L a$) der erfindungsgemäßen Kulturfラスchen (begaste Säulen), herkömmlichen Schüttelkolben und Labor-Rührreaktor.

25

Der volumetrische Sauerstoffeintragskoeffizient $k_L a$ wurde nach der Sulfit-Methode in Kulturfラスchen (Durchmesser 60 mm) mit porösen Filterplatten aus Boro-silikatglas (Porengröße 10 - 16 μm) bei einem Arbeitsvolumen von 150 ml und verschiedenen Gasdurchsätzen be-

30

stimmt ($T = 30^{\circ}\text{C}$). Die erhaltenen Meßergebnisse (siehe Fig. 6) zeigen $k_L a$ -Werte zwischen 0.05 und 0.15 s^{-1} . Zum Vergleich sind Daten aufgetragen, die unter vergleichbaren Bedingungen im Schüttelkolben und im Labor-Rührreaktor ermittelt wurden (Sulfit-Methode, $T = 30^{\circ}\text{C}$).

Es ist deutlich zu erkennen, daß die volumetrischen Sauerstoffeintragskoeffizienten der Kulturflaschen (begaste Säulen) deutlich über den im Schüttelkolben erreichten Werten liegen und die Größenordnung des Labor-Rührreaktors erreichen.

Beispiel 2: Vergleich der Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* in erfindungsgemäßen Kulturflaschen (begaste Säulen) und in herkömmlichen Schüttelkolben.

Zum Vergleich des Fermentationsverlaufes in Kulturflaschen (begaste Säulen) und den herkömmlich im Labor verwendeten Schüttelkolben wurden Parallelansätze durchgeführt. Als Beispielsystem wurde die L-Isoleucin-Herstellung mit einem *Corynebacterium glutamicum* Stamm (KK47x15) des Instituts für Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich gewählt.

Die porösen Filterplatten der im Beispiel 1 verwendeten Kulturflaschen (begaste Säulen) wurden vor dem Einsatz zur Fermentation wie folgt hydrophobisiert:

- Zur Vorbehandlung der Glasoberfläche wurden die begasten Säulen mit 5% Salpetersäure 4 h unter Rückfluß gekocht. Nach einer 12 h Reinigung mit destilliertem Wasser wurden bei 150°C getrocknet.

5

- Zur kovalenten Bindung von Methylgruppen an die Glasoberfläche der porösen Filterplatten werden die begasten Säulen mit 5% Trimethylchlorsilan in Chloroform 4 h unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird 3fach mit Chloroform gewaschen und 48 h bei 50°C im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Danach erfolgt eine 12 h Reinigung mit destilliertem Wasser mit anschließender Trocknung.

10

- 15 Herstellung der Vorkultur: 80 ml sterilisiertes Komplexmedium werden mit 20 ml steriler Glucoselösung (100 g/l) steril im 1000 ml Schüttelkolben vermischt und mit 2% Inoculum aus der Stammhaltung 12 h bei 30°C und 155 U/min inkubiert.

20

Nach der Hitzesterilisation der 1000 ml Schüttelkolben und der Kulturflaschen (begaste Säulen, Porendurchmesser der porösen Filterplatten: 10 - 16 μ m) wurden jeweils 90 ml sterilisiertes Medium und 10 ml Inoculum aus der Vorkultur steril zugegeben (Glucose 20 g/l). Die Schüttelkolben wurden im Schüttelinkubator bei 30°C und 155 U/min kultiviert, die Kulturflaschen (begaste Säulen) im Inkubator bei 30°C und 0.6 l/min befeuchteten Luft.

25

30

Die Meßergebnisse zeigen: Mit den Kulturflaschen (begaste Säulen) lassen sich aufgrund des weitaus besseren Sauerstoffeintrags 4fach höhere L-Isoleucin-konzentrationen erreichen (siehe Fig. 5). Dabei konnte
5 über eine Lactatanalytik nachgewiesen werden, daß in den begasten Säulen keine Sauerstofflimitierung auftritt (kein Gärprodukt Lactat nachweisbar), während die Schüttelkolben sauerstofflimitiert waren (Lactat nachweisbar, siehe Fig. 5).

10

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Serien-Kultivierung von Mikroorganismen bzw. Zellen in begasten Flüssigkeitssäulen,
5 g e k e n n z e i c h n e t d u r c h eine Serie von Kulturflaschen mit einem offenen oder perforierbaren Boden, die oberhalb des Bodens bzw. der Bodenöffnung mit einer gasdurchlässigen porösen Filterplatte ausgestattet sind, deren Poren-
10 feinheit und Hydrophobizität ausreichen, den Flüssigkeitsablauf aus einer darüber befindlichen Kulturflüssigkeitssäule zu unterbinden und die über ihren Boden mit einer Sterilgaszuleitung gasdicht verbunden bzw. zu verbinden.
- 15 2. Vorrichtung nach Anspruch 1,
g e k e n n z e i c h n e t d u r c h einen als Gasverteiler wirkenden, mit Sterileinlaß für Gas versehenen gasdichten Doppelboden für die Sterilgaszuleitung, dessen obere Platte mit einer Serie von Gasauslaßöffnungen aufweisenden Aufnahme-
20 plätzen für den abgedichteten Einsatz der Kulturflaschen versehen ist.
- 25 3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
g e k e n n z e i c h n e t d u r c h im wesentlichen säulenförmige Kulturflaschen mit einer ggf. perforierbar abgedeckten Bodenöffnung bzw. ohne Boden mit einer oberen Verschlusskappe mit
30 Septum-Einsatz.

4. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
gekennzeichnet durch Kultur-
5 flaschen mit einem oberen, zum Einbringen von Meß-
sonden geeigneten Septum-Anschluß.
5. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
10 gekennzeichnet durch einen
seitlichen Stutzen mit Septum-Verschluß für Probe-
nahmen.
6. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
15 gekennzeichnet durch Aufnah-
meplätze, die napfartig mit Durchlaß zum Doppelbo-
denraum ausgebildet und mit am unteren Kulturfla-
schenumfang vorgesehenen zusammenwirkenden Verbin-
20 dungselementen versehen sind, die zur Herbeifüh-
rung eines ausreichenden Anpreßdrucks an einer
Ringdichtung zwischen unterem Flaschenende und
Gasverteiler geeignet sind.
- 25 7. Vorrichtung nach Anspruch 6,
gekennzeichnet durch Schraub-
oder Bajonetverbindungen als Verbindungselemente.
8. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
30 che,

g e k e n n z e i c h n e t d u r c h ggf.
auswechselbare und/oder als Schließventil ausge-
bildete Anstechnadeln im Aufnahmeplatzboden und
Kulturflaschen mit perforierbarem Membran-Boden.

5

9. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprü-
che,

g e k e n n z e i c h n e t d u r c h eine die
Flaschen-Serie übergreifende Abdeckhaube mit Ther-
mostatisierung.

10

10. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprü-
che,

g e k e n n z e i c h n e t d u r c h einen
oder mehrere den Doppelboden in unterschiedliche
Abteile mit jeweils eigener Gasversorgung unter-
teilende Trennwände.

15

11. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprü-
che,

g e k e n n z e i c h n e t d u r c h jeweils
mit Sterilfilter und Gasbefeuchter versehene Gas-
versorgungen.

20

12. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprü-
che,

g e k e n n z e i c h n e t d u r c h Druck-
und Durchflußmesser in der Sterilgaszuleitung.

25

13. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
gekennzeichnet durch Einrichtungen, die die Gasbefeuchter auf gleicher Temperatur halten wie den Kulturraum.
- 5
14. Kulturflaschen für Vorrichtungen nach einem der vorangehenden Ansprüche,
gekennzeichnet durch einen
offenen oder perforierbaren Boden und eine gas-
durchlässige poröse Filterplatte oberhalb des Bodens, deren Porenfeinheit und Hydrophobizität ausreichen, den Flüssigkeitsablauf aus einer darüber befindlichen Flüssigkeitssäule zu unterbinden.
- 10

1/2

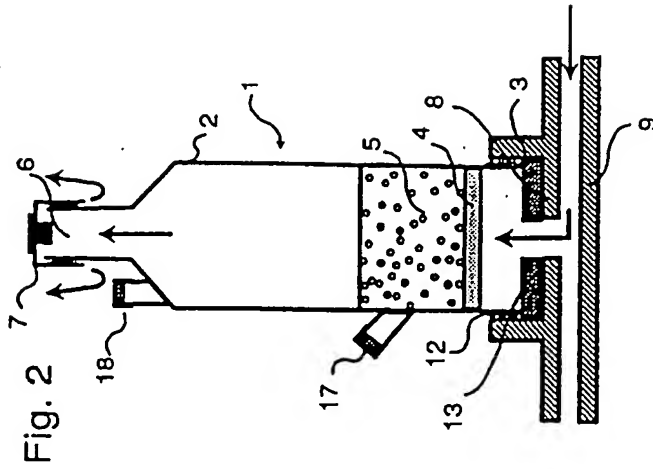


Fig. 3

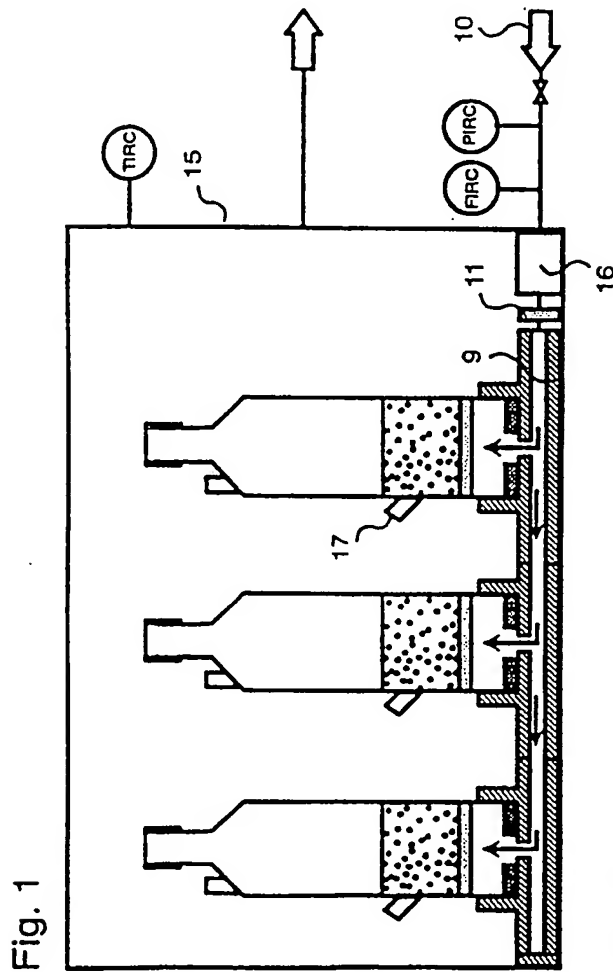
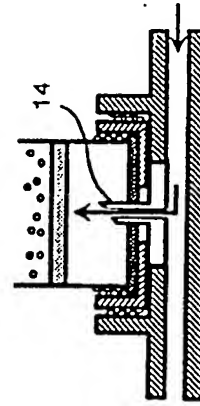
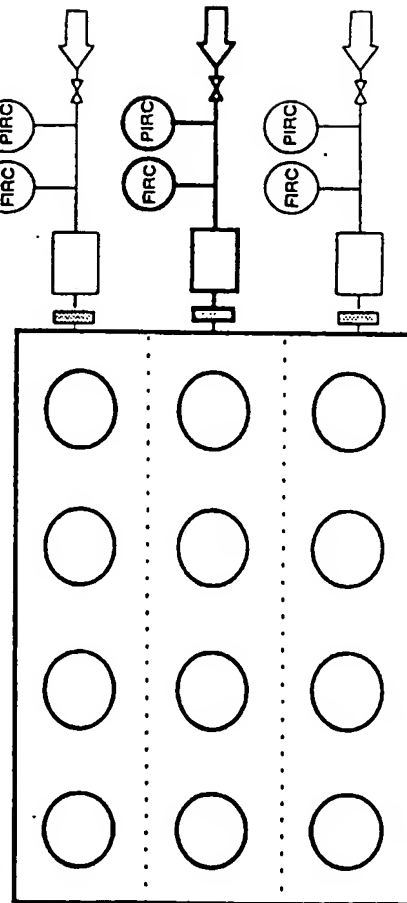


Fig. 4



2/2

Fig. 5

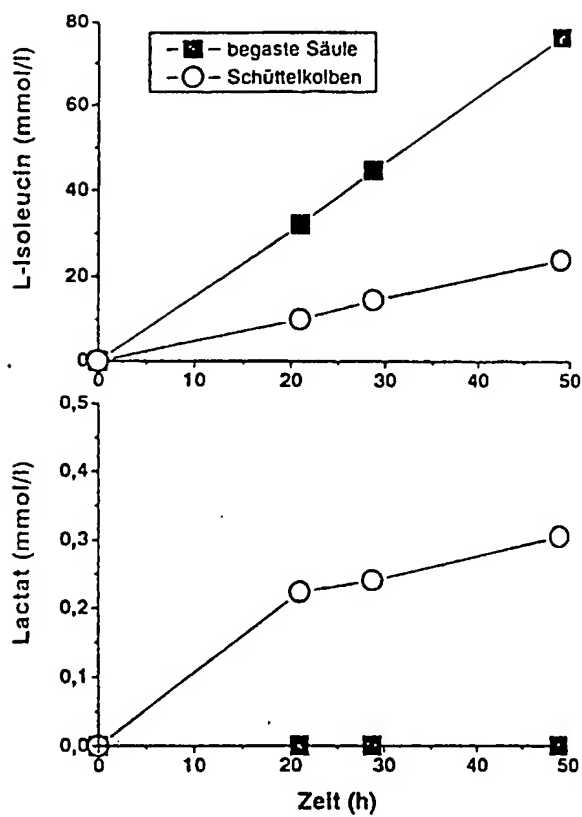
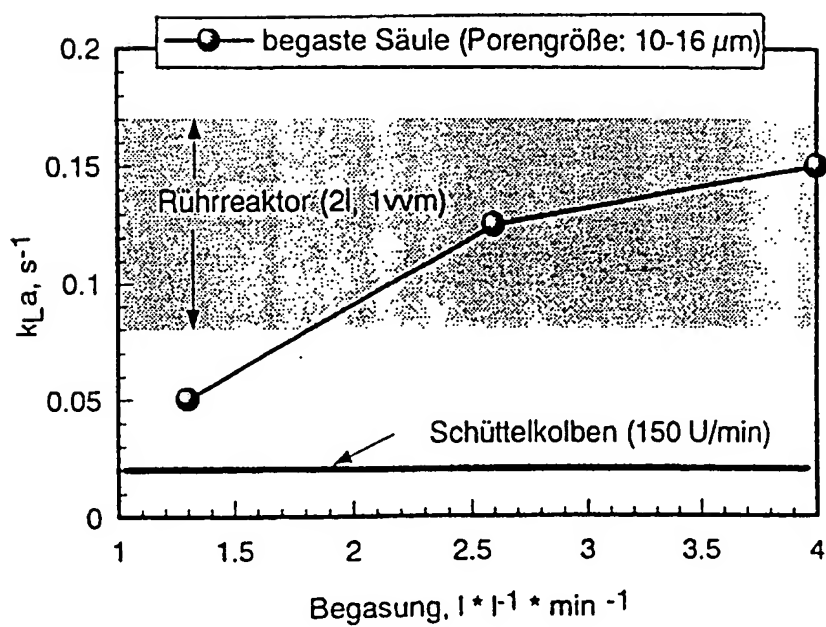


Fig. 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 96/01485

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12M1/24 C12M3/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 307 048 A (CREMONESE JOSEPH GUY) 15 March 1989 see column 12, line 19 - column 14, line 34; claims; figures 10-14 -----	1-6,8-14

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 January 1997

Date of mailing of the international search report

21. 01. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Coucke, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information. patent family members

International Application No

PCT/DE 96/01485

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0307048	15-03-89	US-A- 4839292	13-06-89
		CA-A- 1306714	25-08-92
		DE-D- 3886483	03-02-94
		DE-T- 3886483	14-07-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01485

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12M1/24 C12M3/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 307 048 A (CREMONESE JOSEPH GUY) 15.März 1989 siehe Spalte 12, Zeile 19 - Spalte 14, Zeile 34; Ansprüche; Abbildungen 10-14 -----	1-6,8-14

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Januar 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21. 01. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Coucke, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01485

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0307048	15-03-89	US-A- 4839292	13-06-89
		CA-A- 1306714	25-08-92
		DE-D- 3886483	03-02-94
		DE-T- 3886483	14-07-94
